seems

取扱説明書

EXPREP™　MSC　Medium

□製品概要

EXPREP™　MSC Medium は、間葉系幹細胞（MSC）を無血清で培養することを可能にした培地です。本製品で培養した MSC は、①プラスチック製培養皿に接着性の増殖を示し、②脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨芽細胞への分化誘導が可能であり、③CD73、CD90、CD105 が陽性、CD31、CD34、CD45、HLA-DR が陰性であることが確認されています。

□容量

500ml×1 本

□保存方法

到着後すみやかに-20℃で保存して下さい。解凍後は 2～8℃で保存し、2 週間を目安にご使用下さい。

□特徴

・血清不含有の間葉系幹細胞用無血清培地です。
・浸透圧、pH、無菌性、マイコプラズマ検査、エンドトキシン定量試験済みです。
・DMEM＋10%FBS 培地と比較して高い細胞増殖能力を有します。
・希釈・添加を行うことなくすぐにご使用いただけます（硫酸ゲンタマイシン含有）。
・血清培地で維持した細胞も容易に培養が可能です。
・培養皿への特殊なコーティングは必要ございません。

□使用方法

＜培地の用意＞
・凍結状態の培地を冷凍庫から取り出し、室温もしくは 37℃の温浴で解凍してください。冷蔵庫内での緩やかな解凍は、培地中のタンパク質成分の析出を生じる恐れがあります。
・解凍時に色調が透明な濃赤色であること、液漏れがないことを確認して下さい。

コスモ・バイオ株式会社

＜凍結細胞からの培養方法＞

１．　凍結された MSC が入ったクライオチューブを取り出し、37℃のウォーターバスで急速に解凍し、コニカルチューブに移します。

２．　事前に 37℃に温めた EXPREP™　MSC Medium を、凍結細胞液の 10 倍量以上を用いて、緩やかに凍結細胞が入ったコニカルチューブに滴下します。

３．　400×g で 5 分間遠心分離を行い、細胞をペレットにします。

４．　上清を除き、37℃に温めた EXPREP™　MSC Medium を少量添加して、懸濁液とします。

５．　血球計算版とトリパンブルー染色により、細胞数を計測します。

６．　T-Flask や Dish など、目的に応じた培養皿に播種します。通常、5×10^3 cells/cm^2 で播種します。

７．　37℃、5% CO2 のインキュベーター内に静置して培養を開始します。

８．　24 時間後、EXPREP™　MSC Medium で培地交換を行います。

９．　その後、中 2 日を置いて、EXPREP™　MSC Medium で培地交換を行い、約 90%コンフルエントに到達した時点で、継代培養、もしくは回収保存を行います。培地交換の際には、細胞株によっては培地の半交換が効果的である場合があります。

＜継代培養＞

１．　約 90%コンフルエントに到達した培養皿から培養液を除去します。

２．　PBS(-)でリンスします。

３．　0.6ml/10cm^2 の割合で剥離剤を添加し、37℃で 5 分間インキュベートします。清剥離剤としては、0.05% Trypsin/1mM EDTA や TrypLE™ Express (GIBCO: 12604) などをご使用ください。

４．　細胞の剥離が確認できたら、コニカルチューブに細胞液を移し、培養皿表面を PSS(-)で洗浄して残りの細胞を回収します。

５．　400×g で 5 分間遠心分離を行い、細胞をペレットにします。

６．　EXPREP™　MSC Medium で細胞を懸濁します（剥離剤の洗浄）。

７．　400×g で 5 分間遠心分離を行い、細胞をペレットにします。

８．　上清を除き、少量の EXPREP™　MSC Medium で細胞を懸濁し、セルカウントを行います。

９．　T-Flask や Dish など、目的に応じた培養皿に播種します。通常、5×10^3 cells/cm^2 で播種します。

１０．　37℃、5% CO2 のインキュベーター内に静置して培養を開始します。

１１．　その後、中 2 日を置いて、EXPREP™　MSC Medium で培地交換を行い、約 90%コンフルエントに到達した時点で、継代培養、もしくは回収保存を行います。培地交換の際には、細胞株によっては培地の半交換が効果的である場合があります。

＜細胞の保存＞

1．　回収してペレットにした細胞を用意します。

2．　凍結保存液にやさしく懸濁します。細胞濃度は 1×10^6～5×10^6／ml を基準に、細胞により調製してください。凍結保存液としては、EXPREP™ MSC Medium に 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO)を添加して使用するか、もしくは市販の保存液をご使用ください（タカラバイオ: CB041)。

3．　速やかにクライオチューブに分注します。

4．　バイセル(NFZ: BICELL)にクライオチューブを入れてしっかりと蓋をして、-80℃冷凍庫に投入します。

5．　翌日、バイセルから取り出し、長期保管の為にクライオバイアルを液体窒素タンクに移動します。

□ご注意事項

・本製品は研究用試薬になります。治療、診断目的で使用しないで下さい。また、本製品を当社からの許可なしに第 3 者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

・血清を含まない培地のため、継代時にトリプシンを使用した場合、トリプシンが十分に不活化されない場合があります。遠心分離後に、トリプシンなどの酵素液を十分に除去してください。

・血清添加培地と比較すると、初代培養初期の細胞接着が劣る場合があります。十分な細胞接着が得られるまで、なるべく培養皿を動かさず、安定した接着を促進してください。

・培地交換の際には培地を 37℃に温めてからご使用ください。

・本製品はヒト由来の MSC 増殖培地です。ヒト以外の動物由来の MSC においては、増殖が難しい場合がございます。

□製品のお問合せ

株式会社シームス

E-mail　:info@seems-inc.com

URL　　: http://www.seems-inc.com/index.html

コスモ・バイオ株式会社